

# Pristupi u istraživanju biomarkera shizofrenije

---

Divić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:618950>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivona Divić

# **Pristupi u istraživanju biomarkera shizofrenije**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija na Zavodu za farmakologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te izrađen pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

### ***Zahvala***

*Hvala izv.prof.dr.sc. Lidiji Bach-Rojecky na stručnom vodstvu i velikoj pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Od srca hvala mojoj majci, obitelji i prijateljima koji su od prvog dana bili moja najveća podrška!*

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Definicija shizofrenije .....	1
1.2.	Etiologija shizofrenije .....	2
1.3.	Patofiziologija .....	3
1.4.	Klinička slika.....	5
1.5.	Postavljanje dijagnoze.....	6
1.6.	Biomarkeri.....	8
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	10
3.	MATERIJALI I METODE .....	11
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	12
4.1.	Biomarkeri kod shizofrenije.....	12
4.1.1.	Neurotrofni faktor porijeklom iz mozga (BDNF).....	15
4.1.2.	Molekule uključene u upalu i imunološku funkciju.....	16
4.1.3.	Neurokemija.....	17
4.1.3.1.	Monoaminski putevi .....	17
4.1.3.2.	Glutamatni putevi.....	18
4.1.3.3.	Ostali neurotransmitori.....	19
4.1.4.	Reakcija na oksidativni stres i metabolizam .....	19
4.1.5.	Epigenetska regulacija i micro RNA.....	20
4.1.6.	Istraživanja transkriptoma i proteoma.....	21
5.	ZAKLJUČCI.....	24
6.	LITERATURA.....	25
7.	SAŽETAK/SUMMARY .....	28
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Definicija shizofrenije

Shizofrenija je kronični psihički poremećaj karakteriziran mnoštvom simptoma koji se dijele na pozitivne, negativne te kognitivne. Pozitivni simptomi uključuju deluzije (lažna uvjerenja), halucinacije (obmane osjetila odnosno opažanja koja nastaju u odsutnosti podražaja u vanjskome svijetu), nepovezan govor i katatonično ponašanje (neobične promjene psihomotornih funkcija koja mogu uključivati ekstremno uzbuđenje, potpunu nepokretljivost te blokadu mišića). Negativne simptome karakterizira manjak motivacije i emocionalno povlačenje (Davison i sur., 2017). Shizofreniju također mogu karakterizirati i kognitivni simptomi poput poteškoća u pamćenju, usmjeravanju i održavanju pozornosti tijekom izvršavanja osnovnih mentalnih radnji (Patel i sur., 2014). Simptomi se većinom pojavljuju u adolescenciji ili ranoj odrasloj dobi. Veoma je važno identificirati oboljele u najranijim fazama poremećaja jer rana identifikacija i početak liječenja značajno poboljšava njihove kliničke ishode (Larsen i sur., 2011). Trenutno se dijagnoza shizofrenije oslanja isključivo na subjektivnu interpretaciju kliničkih simptoma koje pokazuju oboljeli. Također, nekoliko poremećaja, kao npr. bipolarni poremećaj i autizam dijele neke simptome shizofrenije, što također može dovesti do poteškoća u postavljanju ispravne dijagnoze (Quinones i Kaddurah-Daouk, 2009). Točan uzrok nastanka shizofrenije još uvijek nije u potpunosti poznat, ali postoje razne teorije koje dokazano objašnjavaju bolest kod rizičnih pojedinaca. Učestalost poremećaja podjednaka je kod muškaraca i žena, iako se simptomi javljaju u ranijoj dobi kod muškaraca. Muškarci svoju prvu epizodu shizofrenije doživljavaju u ranim dvadesetima, dok se kod žena obično javlja u kasnim dvadesetim ili ranim tridesetima (Davison i sur., 2017).

## 1.2. Etiologija shizofrenije

Shizofrenija je psihički poremećaj s prevalencijom od 0,3% do 0,7% (American Psychiatric Association, 2013). Unatoč više od sto godina istraživanja, točan uzrok shizofrenije i dalje nije u potpunosti poznat. Općenito je prihvaćeno da su različiti fenotipovi bolesti posljedica višestrukih čimbenika koji uključuju genetsku osjetljivost i okolišne faktore (Patel i sur., 2014). Razvoj shizofrenije posredovan je brojnim faktorima rizika poput prenatalnih i perinatalnih komplikacija, starije dobi, muškog spola, života u urbanoj sredini, migracijskog statusa, zlouporabe droga (posebice kanabisa, amfetamina, metamfetamina i kokaina) te izloženosti različitim oblicima stresa (fizičko, seksualno i psihičko zlostavljanje) (Nikolac Perković i sur., 2017). Jedno od objašnjenja za razvoj shizofrenije jest da poremećaj počinje *in utero*. Opstetričke komplikacije, koje uključuju krvarenje tijekom trudnoće, gestacijski dijabetes, hitni carski rez, asfiksiju (gušenje i gubitak svijesti fetusa) i nisku porođajnu težinu, povezuju se sa shizofrenijom koja se razvija kasnije u životu. Fetalni poremećaji tijekom drugog tromjesečja ključan su korak u pravilnom, odnosno u ovom slučaju, nepravilnom neurorazvoju fetusa. Infekcije i prevelika izloženost stresu tijekom tog razdoblja povezane su s udvostručenjem rizika nastanka shizofrenije kod potomka (Patel i sur., 2014). Etiologija shizofrenije daleko je od razjašnjenja, ali istraživanja temeljena na obitelji, blizancima i posvajanju upućuju na važnu ulogu genetskih čimbenika, između svih ostalih, već spomenutih faktora. Genetski čimbenici mogu biti povezani s osjetljivošću pojedinca, tj. oni predstavljaju faktore rizika u prisutnosti negativnih okolišnih utjecaja (interakcije gena i okoline), te se ti faktori nazivaju varijantama plastičnosti, budući da ograničavaju osjetljivost na negativne kao i na pozitivne utjecaje okoliša (Nikolac Perković i sur., 2017). Patel i sur. (2014), kao što je već navedeno, podupiru ideju da genetski faktori igraju važnu ulogu u nastanku shizofrenije. Dvije studije su pokazale da je rizik od bolesti oko 10% kod prvog koljena i 3% kod srodstva u drugom koljenu. U slučaju monozigotnih blizanaca, ako jedan blizanac boluje od shizofrenije, rizik da će oboljeti i drugi je 48%, dok je rizik od 12% do 14% kod dvojajčanih blizanaca. Ako oba roditelja imaju shizofreniju, rizik da će oboljeti dijete jest oko 40%. Provedena su istraživanja nad usvojenom djecom kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri rizik od shizofrenije dolazi od bioloških roditelja, odnosno iz okruženja u kojem je dijete odgajano. Ova su istraživanja pokazala da promjene u okolini ne utječu na rizik od razvoja shizofrenije kod djece rođene od oboljelih roditelja. Genetska osnova za shizofreniju dodatno je potvrđena saznanjima da braća i sestre sa shizofrenijom često doživljavaju početak poremećaja u istoj

dobi. Međutim, etiopatogeneza shizofrenije te interakcije genotipa i okoline ostaju u velikoj mjeri nerazjašnjeni, zbog čega je potreban oprez pri donošenju zaključaka o veličini genskog doprinosa u etiologiji poremećaja (Henriksen i sur., 2017).

### 1.3. Patofiziologija

Postoje različite teorije o nastanku patofizioloških promjena kod shizofrenije, pri čemu su neurokemijske teorije i dalje potkrijepljene s najviše znanstvenih dokaza (Patel i sur., 2014). Većina tih teorija usredotočuje se na višak ili nedostatak neurotransmitora, uključujući dopamin, serotonin i glutamat. Druge teorije impliciraju neurotransitorske putove preko aspartata, glicina i gama-aminomaslačne kiseline (GABA-e) kao dio neurokemijske neravnoteže u patofiziologiji shizofrenije. Smatra se da je abnormalna aktivnost dopaminskog sustava (posebno preko D2 podtipa receptora) povezana s mnogim simptomima shizofrenije. Obuhvaćena su četiri dopaminergična puta. Nigrostrijalni put počinje u supstanciji nigri i završava u kaudalnoj jezgri. Smatra se da niske razine dopamina unutar ovog puta utječu na ekstrapiramidalni sustav, što dovodi do motoričkih simptoma. Mezolimbčki put se proteže od ventralnog tegmentalnog područja do limbičkog područja te može uslijed pretjerane aktivnosti imati ulogu u nastanku pozitivnih simptoma shizofrenije. Mezokortikalni put se proteže od ventralnog tegmentalnog područja do korteksa. Smatra se da su negativni simptomi i kognitivni deficiti u shizofreniji uzrokovani niskom razinom mezokortikalnog dopamina. Tuberoinfundibularni put proteže se od hipotalamusa do hipofize (Patel i sur., 2014). Smanjenje dopaminske neurotransmisije u tuberoinfundibularnom putu, često uslijed djelovanja antipsihotika, dovodi do povišenih razina prolaktina te kao posljedica toga dolazi do galaktoreje (lučenje mlijeka u muškaraca te u žena koje ne doje), amenoreje (izostanak menstruacije) i smanjenog libida.

Serotonin, odnosno 5-hidroksitriptamin (5-HT), važan je neurotransmitor u perifernim tkivima, ali i u središnjem živčanom sustavu (SŽS) gdje, između ostalog, sudjeluje u kontroli raspoloženja. Daljnja istraživanja dovela su do razvoja lijekova koji blokiraju i dopaminske i serotoninске receptore za razliku od starijih lijekova, koji su utjecali samo na dopaminske receptore. Otkriveno je da su noviji lijekovi učinkovitiji u ublažavanju i pozitivnih i negativnih simptoma shizofrenije (Patel i sur., 2014).

Posljednja istraživanja se sve više temelje na istraživanju povezanosti dopamina, glutamata i GABA-e u patofiziologiji shizofrenije. Postmortalna istraživanja tkiva mozga pacijenata sa shizofrenijom potvrdila su uključenost ovih sustava u razvoj shizofrenije, no točni mehanizmi i interakcije s dopaminskim i serotoninskim sustavom potrebno je detaljnije istražiti (Kahn i sur., 2015). GABAergični neuroni ne smanjuju se brojem kod pacijenata sa shizofrenijom, ali ekspresija gena za glutamatnu dekarboksilazu 1 (*GADI*), enzima koji je potreban za sintezu GABA-e, je promijenjena. Također su pronađeni smanjeni molekularni markeri povezani sa smanjenom neuronalnom aktivnosti GABA sustava u određenim regijama mozga, posebice u prefrontalnom korteksu kod shizofrenije (Hyde, 2011). Ti neuroni izražavaju parvalbumin te su ključni za uspostavljanje kortikalne aktivnosti, poput oscilacija gama frekvencije, koje se smatraju abnormalnima u shizofreniji te mogu biti podloga za disfunkciju moždane aktivnosti (Curley i sur., 2012). Nedavno istraživanje sugerira da je smanjenje *GADI* ekspresije izravno povezano s epigenetskim promjenama s posljedičnom represivnom strukturom kromatina koja regulira ovaj gen. Iako su dokazi o promjenama molekularnih markera GABA-e u mozgu shizofrenih pacijenata brojni, ove promjene nisu specifične budući da su slične GABA abnormalnosti također pokazane u drugim neuropsihijatrijskim poremećajima, uključujući depresiju, anksioznost i autizam (Kahn i sur., 2015).

Posljedna teorija uključuje promijenjenu aktivnost glutamatnog sustava, glavnog ekscitatornog neurotransmitskog sustava u mozgu. Ova teorija povijesno se temelji na opažanjima u kojima fenilciklidin i ketamin, dva nekompetitivna antagonista NMDA (N-metil-D-aspartat) glutamatnih receptora dovode do simptoma sličnih shizofreniji (disocijativno stanje, kognitivni problemi, bizarno ponašanje). To znači da su NMDA receptori hipoaktivni u normalnoj regulaciji mezokortikalnih dopaminskih neurona i ukazuje na moguće objašnjenje zašto pacijenti sa shizofrenijom pokazuju negativne, afektivne i kognitivne simptome (glutamat je ključan neurotransmiter u procesima učenja i pamćenja) (Dauvermann i sur., 2017).

Osim neurokemijskih promjena, pokazano je da moždano tkivo doživljava određene morfološke promjene kod nekih pacijenata sa shizofrenijom. Na primjer, osim povećanja moždanih komora, pojedinci s visokim rizikom od shizofrenije imaju manji srednji temporalni režanj (Patel i sur., 2014).



## 1.4. Klinička slika

Shizofrenija je ozbiljan, složen i iscrpljujući neuropsihijatrijski poremećaj koji je tradicionalno povezan s lošim ishodima liječenja u odnosu na druge psihijatrijske poremećaje. To je heterogeni poremećaj sa simptomima koji su toliko različiti od pacijenta do pacijenta da nije moguće definirati jedan općeniti klinički profil već ga je potrebno “grupirati” u više različitih skupina. Svaki je simptom važan jer kliničar pokušava razlikovati shizofreniju od drugih psihotičnih poremećaja, kao što su shizoafektivni poremećaj, depresivni poremećaj s psihotičnim značajkama i bipolarni poremećaj s psihotičnim značajkama (Patel i sur., 2014). Ne postoji jedan simptom koji je dovoljan da bi se dijagnosticirala shizofrenija, već postoji više specifičnih simptoma koji pomažu u diferencijalnoj dijagnozi. Kao što je ranije spomenuto, simptomi shizofrenije kategorizirani su kao pozitivni, negativni i kognitivni. Pozitivni simptomi uključuju distorzije u percepciji (halucinacije), lažna uvjerenja ili iskrivljeni tijek misli (zablude), nejasno ili zbunjeno razmišljanje i dezorganizirani govor. Ovi se simptomi općenito tumače kao gubitak dodira sa stvarnošću i prisutni su tijekom psihotičnih epizoda koje se smatraju ključnom značajkom poremećaja. Iako ovi simptomi mogu biti prisutni i tijekom remisije, lijekovima se može postići njihova dobra kontrola i povlačenje (Wearne i Cornish, 2018).

Negativni simptomi, s druge strane, odnose se na ponašanje/funkcije koja su obično odsutna ili smanjena kod osoba sa shizofrenijom u odnosu na zdrave. To uključuje socijalno povlačenje, anhedoniju (potpuna odsutnost zadovoljstva onime što pojedinac radi), motoričku retardaciju i siromašan govor. Negativni simptomi značajno utječu na normalan život i neovisnost te ukazuju na vjerojatnu nemogućnost daljnjeg samostalnog funkcioniranja, zapošljavanja, neovisnosti i društvenog kontakta (Wearne i Cornish, 2018).

Treća osnovna skupina simptoma su kognitivni, a mogu se ispoljavati kao umjereni do jaki deficit u općoj inteligenciji, pažnji, radnoj memoriji, verbalnom učenju i pamćenju, brzini obrade informacija te izvršnim funkcijama. Kognitivni deficiti u shizofreniji su stabilni tijekom cijelog trajanja bolesti, što znači da su konstantni i prisutni kod pacijenata s prvom epizodom, kao i kod kroničnih bolesnika. Međutim, postoje dokazi da osobe s ranom pojavom shizofrenije mogu imati opadanje kognitivnih funkcija tijekom progresije bolesti. Smanjenje izvršnih funkcija je najčešći kognitivni deficit kod bolesnika sa shizofrenijom,

posebice među oboljelim starijim osobama (Wearne i Cornish, 2018). Primarni simptomi i komorbiditeti (bolesti koje se često javljaju paralelno) povezani sa shizofrenijom mogu u konačnici dovesti do socijalne i profesionalne disfunkcije. Funkcionalne posljedice uključuju neadekvatno obrazovanje koje može utjecati na pacijentovu sposobnost dobivanja i održavanja stabilnog posla. Pacijenti sa shizofrenijom većinom imaju problema u uspostavi i održavanju socijalnih kontakata. U kontroli bolesti većini je potrebna svakodnevna skrb i podrška članova obitelji.

Prognoza za bolesnike sa shizofrenijom općenito je nepredvidiva. Samo 20% ima pozitivne ishode liječenja, tj. potpuno se oporavi, a kod 10% bolesnika dolazi do progresivne deterioracije tijekom života. Treba istaknuti da i bolesnici koji nikada ne dožive potpuni oporavak mogu imati prihvatljivu kvalitetu života, ako dobiju adekvatnu podršku i pomoć. Velik broj bolesnika ima recidive psihotičnih epizoda tijekom liječenja, a određeni postotak oboljelih ima tzv. rezistentnu shizofreniju kod kojih nije moguće postići željene terapijske ciljeve (Patel i sur., 2014).

## 1.5. Postavljanje dijagnoze

Kao što je prije navedeno, shizofrenija je kronična bolest s mnoštvom simptoma. Dijagnoza shizofrenije se postiže kroz procjenu specifičnih simptoma i znakova kod pacijenta. Dijagnoza se postavlja klinički na temelju anamneze pacijenta i pregledom mentalnog stanja. Dijagnostički testovi ili biomarkeri koji bi omogućili postavljanja dijagnoze još uvijek nisu otkriveni. Shizofrenija se obično prezentira kao psihoza. Prema petom izdanju Dijagnostičkog i statističkog priručnika mentalnih poremećaja (DSM-5), glavne diferencijalne dijagnoze su afektivne psihoze (bipolarni poremećaj s psihotičnim značajkama i glavni depresivni poremećaj s psihotičnim značajkama) te ostale usko povezane neafektivne psihoze (shizoafektivni poremećaj, shizofrenoformni poremećaj, poremećaj s deluzijama, kratki psihotični poremećaj i psihotični poremećaji koji nisu još točno specificirani), psihotični poremećaji izazvani alkoholom ili drugim tvarima i psihotični poremećaji uzrokovani općom medicinskom bolešću (American Psychiatric Association, 2013). Prema međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB-10) postoje različite vrste shizofrenije i sličnih poremećaja

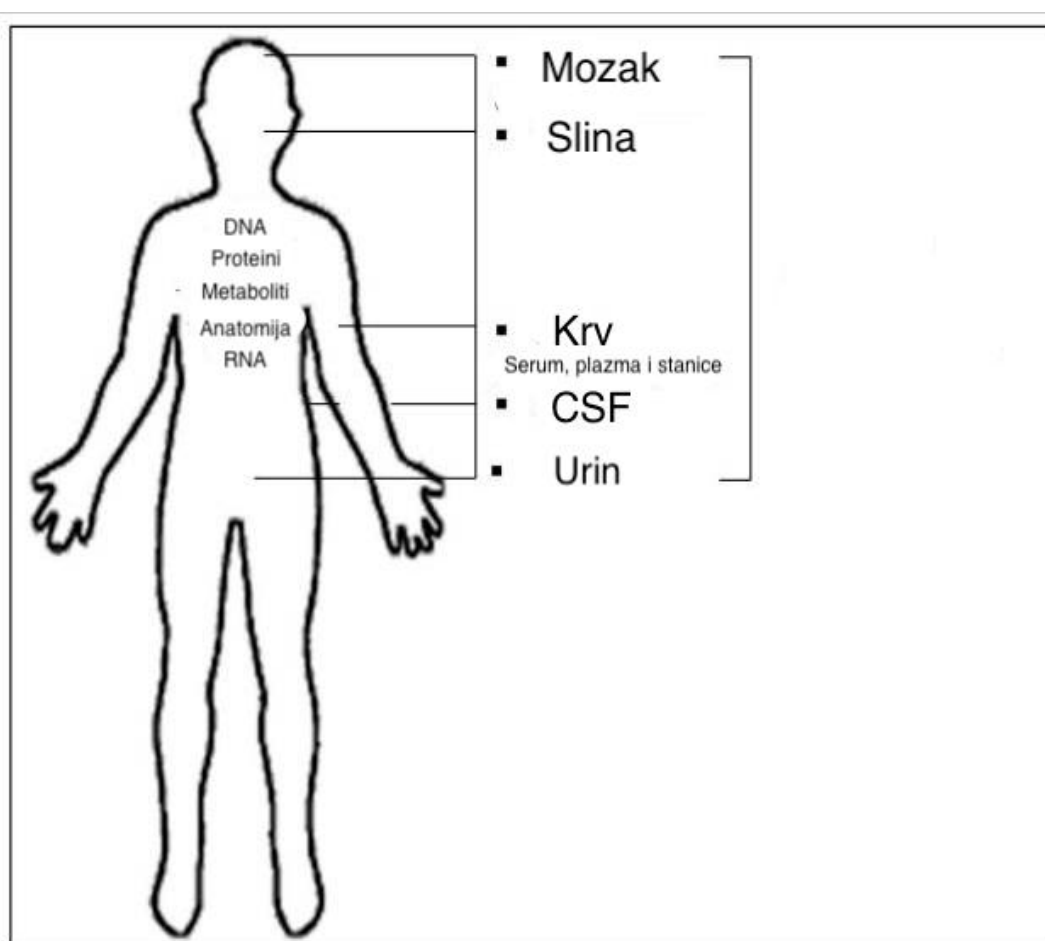
(Tablica 1). Diferencijalna dijagnoza uzima u obzir trajanje bolesti, prirodu i povezanost sa zlouporabom lijekova i droga, depresiju ili maniju i prisutnost somatske bolesti (Owen i sur., 2016). Većina psihijatrijskih dijagnoza ima slične simptome te granica između shizofrenije i drugih poremećaja je ponekad nejasna, također i granica između samog poremećaja i zdravog stanja (Owen i sur., 2016).

Tablica 1. Psihотиčki poremećaji prema MKB-10 (preuzeto s [www.plivamed.net/medicus/clanak/13398/Klinicka-obiljezja-i-dijagnoza-psihoticnih-poremecaja.html](http://www.plivamed.net/medicus/clanak/13398/Klinicka-obiljezja-i-dijagnoza-psihoticnih-poremecaja.html))

F20 Shizofrenija
F20.0 Paranoidna shizofrenija
F20.1 Hebefrena shizofrenija
F20.2 Katatona shizofrenija
F20.3 Nediferencirana shizofrenija
F20.4 Postshizofrena depresija
F20.5 Rezidualna shizofrenija
F20.6 Obična shizofrenija
F20.8 Ostala shizofrenija
F20.9 Shizofrenija, nespecificirana
F21 Poremećaj sličan shizofreniji
F22 Perzistirajuća sumanuta stanja
F22.0 Paranoja – sumanuto stanje
F22.8 Ostala stalna sumanuta stanja
F22.9 Stalno sumanuto stanje, nespecificirano
F23 Akutni i prolazni mentalni poremećaji
F23.0 Akutni polimorfni psihotični poremećaj bez simptoma shizofrenije
F23.1 Akutni polimorfni psihotični poremećaj sa simptomima shizofrenije
F23.2 Akutni mentalni poremećaj sličan shizofreniji
F23.3 Ostali akutni, pretežito sumanuti psihotični poremećaji
F23.8 Ostali akutni i prolazni psihotični poremećaji
F23.9 Akutni i prolazni psihotični poremećaji, nespecificirani
F24 Inducirano sumanuto stanje
F24 Folie à deux
F25 Shizoafektivni poremećaji
F25.0 Shizoafektivni poremećaj, manični tip
F25.1 Shizoafektivni poremećaj, depresivni tip
F25.2 Shizoafektivni poremećaj, mješoviti tip
F25.8 Ostali shizoafektivni poremećaji
F25.9 Shizoafektivni poremećaj, nespecificiran
F28 Ostali neorganski psihotični poremećaji
F29 Neorganske psihoze, nespecificirane

## 1.6. Biomarkeri

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji biomarkeri se definiraju kao bilo koja mjera koja reflektira interakciju između biološkog sustava i potencijalnog kemijskog, biološkog ili fizikalnog štetnog čimbenika. Biomarkeri najčešće označavaju proteine izmjerene u tjelesnoj tekućini, većinom krvi, čija koncentracija ukazuje na normalan ili patološki odgovor organizma, kao i farmakološki odgovor na primijenjenu terapiju (Slika 1) (Davison i sur., 2017).



*Slika 1 - Biomarkeri koji se mogu izmjeriti ili odrediti iz post-mortem mozga ili pomoću in vivo neuro slika, kao i iz perifernih stanica i lako dostupnih tjelesnih tekućina kao što su plazma / serum, slina, urin ili cerebrospinalna tekućina (CSF) (preuzeto iz Nikolac Perković i sur., 2017)*

Općenito se mogu definirati kao pokazatelj intenziteta bolesti ili drugog fiziološkog stanja u organizmu. Kao što se već može zaključiti, biomarkeri imaju vrlo važnu ulogu u medicinskim istraživanjima i praksi, pružajući uvid u mehanizam i tijek bolesti.

Budući da danas postoji velik broj biomarkera koji se koriste u različite svrhe, klasificirani su na: 1) prethodne biomarkere, koji ukazuju na rizik od pojave bolesti, 2) biološke markere za određivanje subkliničkog oblika bolesti, 3) dijagnostičke biomarkere, koji otkrivaju postojeću bolest, 4) biomarkere koji određuju stupanj i težinu bolesti, i 5) prognostičke biomarkere koji potvrđuju tijek bolesti, uključujući i odgovor na liječenje (Majkić-Singh, 2011). Njihov klinički značaj ovisi o osjetljivosti, specifičnosti, prediktivnoj vrijednosti, preciznosti, pouzdanosti te mogućnosti jednostavne i široke primjene. Svaki biomarker koji se koristi nakon validacije posjeduje određene karakteristike u kojima zadovoljava stroge zahtjeve koji se odnose na osjetljivost, točnost i preciznost, te zadovoljavanjem ta tri uvjeta jedino može doći do ispravnog rezultata (Majkić-Singh, 2011). Kod bolesti poput shizofrenije sama klinička interpretacija simptoma ima ograničenu predikativnu vrijednost, stoga se smatra da će biološki markeri kao prediktori imati važnu ulogu (Davison i sur., 2017).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razumijevanje neurobioloških procesa i progresije shizofrenije prvi je korak u razvoju novih pristupa i novih terapijskih intervencija. Istraživanje novih biomarkera izuzetno je važno kada je cilj rana dijagnoza (predviđanje) i precizna terapija bolesti. Ispitivanje biomarkera i njihovog potencijala kao prediktora, dijagnostičkih alata i terapijske orijentacije zahtijeva odgovarajuću metodološku strategiju (Rodrigues-Amorim i sur., 2017).

Razvijeni su različiti laboratorijski pristupi za prepoznavanje mogućih biomarkera i njihove funkcije u patofiziologiji shizofrenije. Zbog složenosti i heterogenosti same bolesti postoji nekoliko mogućih skupina biomarkera koji mogu označiti ili pratiti više temeljnih patofizioloških procesa u pozadini shizofrenije. Potraga za specifičnim biomarkerima brzo napreduje, a uporaba kombinatorne i komplementarne analize omogućuje i bolje modeliranje same bolesti (Vawter i sur. 2011).

Cilj ovog diplomskog rada bio je opisati trenutnu vrijednost biomarkera za postavljanje dijagnoze i/ili terapijsko praćenje shizofrenije.

### 3.MATERIJALI I METODE

Za potrebe pisanja ovog teorijskog diplomskog rada pretraživane su različite bibliografske baze podataka poput PubMed, Science Direct, Scopus, te znanstvene i stručne knjige. Članci od interesa za temu rada su pregledani i raspravljani u tekstu. Baze podataka pregledavane su prema različitim kombinacijama ključnih riječi: “schizophrenia”, “biomarkers”, “symptoms of schizophrenia”, “antipsychotics”, “aripiprazole”, “patophysiology“, „neurotransmitter systems“.

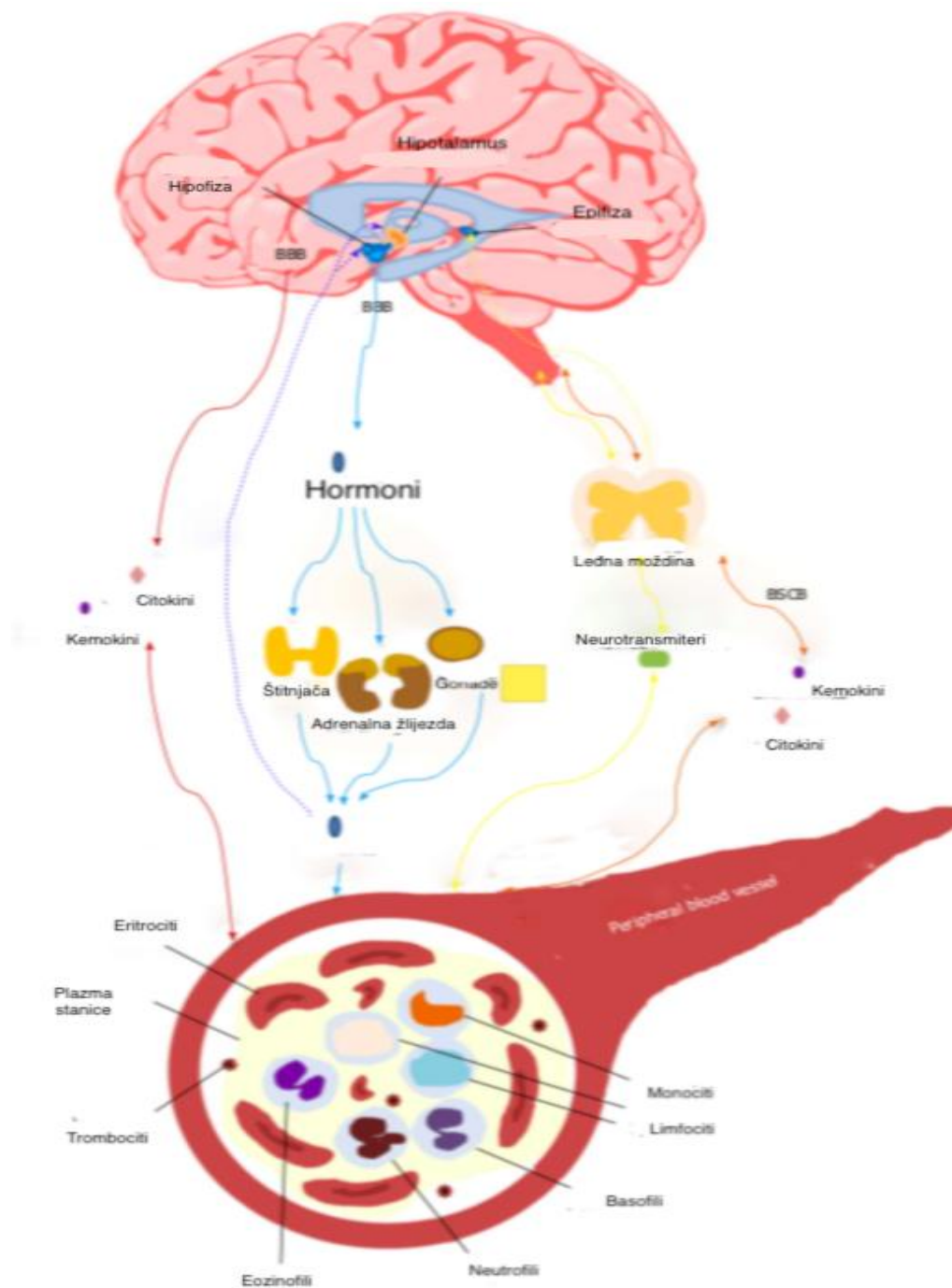
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Biomarkeri kod shizofrenije

Identifikacija biomarkera u dijagnostici shizofrenije ili kao prediktora odgovora na liječenje shizofrenije predstavljao bi vrlo važan napredak koji bi mogao omogućiti personalizirano liječenje te razvoj novih lijekova u budućnosti. Kao što je već navedeno, shizofrenija je psihijatrijski poremećaj kojem su u podlozi kompleksne abnormalnosti u funkciji središnjeg živčanog sustava (na razini neurona i glija stanica). Usprkos velikom napretku u razumijevanju etiopatogeneze, ne postoje specifični biomarkeri spomenutih središnjih promjena koji bi bili primjenjivi u kliničkoj praksi jer invazivni zahvati poput biopsije moždanog tkiva nisu prihvatljivi, tehnike snimanja su skupe, a rezultati su nespecifični (Lai i sur., 2016). Tako se posljednjih godina provode razna istraživanja u kojima se kao alternativa invazivnim, skupim i nespecifičnim tehnikama traže biološka obilježja shizofrenije u perifernoj krvi. Biomarkeri koji se mogu detektirati u krvi smatraju se prihvatljivom opcijom budući da se u u tom uzorku mogu detektirati različite promjene na razini ekspresije gena koji kodiraju za određene proteine, te različite metaboličke i upalne molekule koje su prisutne u oboljelih sa shizofrenijom, ali ne kod zdravih osoba (Tomasik i sur., 2014). U novije vrijeme razumijevanje interakcija između mozga i periferije prošireno je saznanjima koja sugeriraju da SŽS može utjecati na ekspresiju gena i metabolizam u perifernoj krvi putem citokina, neurotransmitora ili hormona, dok imunološke promjene u SŽS-u mogu biti posljedica djelovanja molekula iz periferne krvi (Slika 2). Iako postoje neki ohrabrujući preliminarni podaci koji ukazuju na postojanje perifernih biomarkera za shizofreniju, s obzirom na heterogenost bolesti i različite podtipove, vjerojatnost da će oni biti korisni u dijagnostici i praćenju liječenja je mala, tj. može se očekivati samo u određenoj populaciji oboljelih (Lai i sur., 2016). Iako se većina studija usredotočila na dijagnozu shizofrenije, biomarkeri koji mogu predvidjeti klinički tijek bolesti ili odgovor na liječenje određenim lijekom u budućnosti bi trebali biti od velike kliničke važnosti. Iako je upotreba konvergentnih metoda funkcionalne genomike dobra ideja, dosad se odabir većine kandidata biomarkera temeljio na nalazima povezanim s promjenama u SŽS-u (Lai i sur., 2016). Sukladno tome, istraživanja biomarkera se mogu razvrstati u kategorije koje uključuju: (1) istraživanja povezana s neurotrofnim faktorom koji potiče iz mozga (BDNF) i (2) molekulama uključenim u upalu i



imunološku funkciju; zatim (3) neurokemije analize; (4) ispitivanja molekula uključenih u oksidativni stres i metabolizam; (5) epigenetsku regulaciju i miRNA; i (6) analize transkriptoma i proteoma (Lai i sur., 2016).



Slika 2 - Shematski prikaz međudjelovanja središnjeg živčanog sustava i perifernog tkiva (preuzeto i prilagođeno prema Lai i sur., 2016).

Izloženost stresu može utjecati na ekspresiju gena, metilaciju DNA i metabolizam stanica u perifernoj krvi putem djelovanja citokina, neurotransmitora ili hormona s različitim načinima transporta iz CNS-a do perifernih stanica. Citokini ili kemokini mogu se transportirati preko krvno-moždane barijere (crvene linije) ili krvno- kralježničke barijere (narančasta linija) iz

CNS-a na periferiju ili obrnuto. Hormoni djeluju na CNS i transportiraju se preko krvno-moždane barijere putem do ciljnog tkiva (plave linije) i povratno negativno reguliraju CNS (plave isprekidane linije). Druga je veza stimulirana (žuta linija) ili inhibicija negativne povratne sprege (žuta isprekidana linija) preko parasimpatičkog ili simpatičkog živčanog sustava.

#### 4. 1. 1. Neurotrofni faktor porijeklom iz mozga (BDNF)

Pretpostavlja se da je shizofrenija povezana s promijenjenom razinom neurotrofina u krvi, osobito sniženom razinom BDNF-a. Nedavna meta-analiza od ukupno 41 studije i više od 7000 sudionika pokazala je da su razine BDNF u serumu/plazmi umjereno snižene u bolesnika oboljelih od shizofrenije u usporedbi sa zdravim osobama. Koristeći DNA iz pune krvi, također se može naslutiti da promotorska regija *BDNF* gena ima višu razinu metilacije kod oboljelih, a ta promjena može biti prisutna i u mozgu. Iako je meta-analiza pokazala da razina BDNF- a u serumu/plazmi nije u korelaciji s pozitivnim ili negativnim simptomima bolesti, razine BDNF u plazmi bile su pozitivno povezane s određenim kognitivnim funkcijama. Usprkos obećavajućim rezultatima, određivanje BDNF u plazmi vjerojatno se neće pokazati posebnim specifičnim biomarkerom za shizofreniju, jer su snižene razine BDNF-a u plazmi također prisutne u bipolarnom poremećaju i velikom depresivnom poremećaju (Lai i sur., 2016). Uspoređujući rezultate analize periferne krvi s funkcionalnim oslikavanjem mozga pokazano je da razina BDNF u serumu/plazmi pozitivno korelira s N-acetilaspertatom, markerom integriteta neurona, te s moždanom aktivnosti u parijetalnom korteksu. To bi značilo da periferna razina BDNF-a može biti prognostički marker, jer se vraća u normalu tijekom remisije akutnih stanja bipolarnog poremećaja i velikog depresivnog poremećaja (Tomasik i sur., 2014). Pokaže li se u osoba sa shizofrenijom slična promjena u razini BDNF-a tijekom različitih faza bolesti, bit će potrebna dodatna istraživanja i novi dokazi. Dokazi o utjecaju liječenja antipsihoticima na razinu BDNF-a su neujednačeni i nejasni. Dok je jedna meta-analiza pokazala korelaciju između primjene antipsihotika i povećanje razine BDNF u plazmi, ali ne i u serumu, većina studija daju negativne rezultate (Lai i sur., 2016). Vjerojatno će biti potrebna detaljnija longitudinalna ispitivanja da bi se utvrdilo je li promjena razine BDNF u serumu/plazmi dobar biološki biljeg poremećaja ili ima

neku prognostičku vrijednost kao biomarker faze/stadija bolesti, koji može predvidjeti učinkovitost liječenja (Tomasik i sur., 2014).

## 4. 1. 2. Molekule uključene u upalu i imunološku funkciju

Druga kategorija bioloških putova kojoj se pridaje dosta pažnje u potrazi za markerima za shizofreniju su oni uključeni u imunološke/upalne procese. Opsežni pregled serumskih/plazma biomarkera koji se razlikuje u osoba sa shizofrenijom od kontrola upućuje na to da je više od 70% potencijalnih biomarkera uključeno u posredovanje upalnog odgovora. Neki od biomarkera uključuju S100 kalcij-vezujući protein B (S100B), proupalne interleukine (IL6, IL2, IL1 $\beta$  i IL8) i faktor nekroze tumora (TNF). Nadalje, pokazalo se da su razine mRNA TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  povišene kod osoba sa shizofrenijom i njihove braće i sestara, u usporedbi sa zdravim ispitanicima, dok je smanjena mRNA interferona  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Međutim, treba napomenuti da su navedeni upalni biomarkeri povišeni i kod oboljelih s bipolarnim poremećajem, što govori o nespecifičnosti primjećениh promjena za shizofreniju (Lai i sur., 2016). Također, kod ispitivanja biokemijskih svojstava histona, tj. ukupne sinteze histona i varijante H2A i H3 histona limfocita, dobivene su promjene zajedničke i za shizofreniju i za bipolarni poremećaj. Rezultati istraživanja dodatno pokazuju da se periferni markeri mogu mijenjati u različitim fazama bolesti, ali zajedno sugeriraju da se periferni imunski sustav prekomjerno aktivira kod pojedinaca nakon prve epizode psihoze i onih s već dijagnosticiranom shizofrenijom. Međutim, važno je napomenuti da se imunski sustav prilagođava promjenama u mikrookolini, bilo uslijed bolesti ili primjene lijekova, ali nedostaje studija koje bi to ciljano ispitivale (Lai i sur., 2016). Postoje dokazi koji ukazuju na to da su razine nekih upalnih molekula u krvi povezane s intenzitetom i ozbiljnošću simptoma shizofrenije (Tomasik i sur., 2014). Primjerice, viša razina IL2 u plazmi mogla bi se protumačiti kao biološki marker specifičan za shizofreniju koji može biti povezan s kliničkim simptomima i kognitivnim funkcijama, posebice jer se njegove razine smanjuju nakon primjene antipsihotika. Neke od ovih promjena markera imunskog sustava u korelaciji su s odgovorom na liječenje i kliničkim fenotipom, što ih čini prikladnima za praćenje učinkovitosti liječenja. Međutim, potrebna su daljnja dobro dizajnirana klinička istraživanja kako bi se utvrdio stvarni klinički potencijal pojedinih biomarkera (Dean, 2014).

## 4. 1. 3. Neurokemija

### 4. 1. 3. 1. Monoaminski putovi

Monoaminski neurotransmitori poput dopamina, noradrenalina ili serotonina povezuju se s patogenezom shizofrenije, a farmakološka terapija razvijana je upravo kako bi ciljano djelovala na spomenute sustave, prvenstveno dopaminski i serotoniniski (Lai i sur., 2016). Brojni potencijalni markeri dopaminergičkog sustava su evaluirani kod shizofrenije, što uključuje dopaminske receptore (tj. DRD2, DRD3 i DRD4), dopaminski transporter i druge molekule, poput primjerice enzima tirozin hidroksilaze. Ekspresija mRNA i vezivanje specifičnih obilježenih liganada za DRD2 receptore povećana je na limfocitima bolesnika sa shizofrenijom koji nisu odgovarali na farmakoterapiju, međutim u daljnjim istraživanjima to nije ponovljeno (Marazziti i sur., 2010). Postoje dokazi koji ukazuju da razina mRNA DRD2 pozitivno korelira s pozitivnim simptomima shizofrenije. Zabilježeno je da je razina mRNA za limfocitne DRD3 povišena i kod bolesnika s kroničnom shizofrenijom, i kod onih koji su nisu odgovarali na farmakološko liječenje. Isto je pokazano i u osoba oboljelih od bipolarnog poremećaja. I ovdje je važno napomenuti da su zabilježene promjene mRNA DRD3 različite, ovisno o bolesti, primjerice povišene su kod ovisnika o heroinu, dok je mRNA DRD4 snižen kod teške depresije te tijekom odvikavanja od alkohola i heroina (Marazziti i sur., 2010). Promjene markera za dopaminske receptore i dopaminski transporter su veće u limfocitima bolesnika s kroničnom shizofrenijom u usporedbi s kontrolama. Suprotno tome, smanjeno obilježavanje dopaminskog transportera sugerira manji broj transportnih proteina za dopamin (Dean, 2014). Ostale promjene, poput povišenja koncentracije homovanilne kiseline u plazmi, produkta biotransformacije dopamina, zabilježene su u različitim fazama shizofrenije, ali ne i kod bipolarnog poremećaja, što sugerira određenu specifičnost za shizofreniju (Lai i sur., 2016). Općenito, neki markeri (pr. tirozin hidroksilaza, homovanilna kiselina), koji su dokazano promijenjeni i kod oboljelih u akutnoj i prodromalnoj fazi, mogu se pokazati kao prognostički za visoko rizične pojedince, poput onih s pozitivnom obiteljskom anamnezom bolesti (Lai i sur., 2016). Međutim, treba uzeti u obzir da biomarkere za molekule monoaminskog sustava možemo koristiti kao markere akutnog stanja bolesti budući da većina antipsihotika blokira monoaminske receptore i u SŽS-u i na periferiji, što maskira pozitivne rezultate. Zbog toga, molekule povezane s monoaminskim putovima ne možemo definirati kao markere za praćenje terapije, nego kao markere akutnog stanja (Singh i sur., 2003).

## 4. 1. 3. 2. Glutamatni putovi

Budući da glutamatna disregulacija može imati ulogu u patogenezi shizofrenije, postoji veliko područje istraživanja usmjerenih na periferne razine ili funkcije aminokiselina, poput glutamata, D-serina, L-serina, glicina i agmatina, koje aktiviraju N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore glutamata i uključeni su u modulaciju glutamatne signalizacije. Većina studija bila je usredotočena na periferne razine glutamata u osoba sa shizofrenijom (Lai i sur., 2016). U meta-analizi od 10 istraživanja zabilježene su više razine glutamata u krvi pacijenata sa shizofrenijom u usporedbi s kontrolama. Međutim, slično zabilježeno i u malom broju istraživanja koja su bila usredotočena uglavnom na depresivni poremećaj, sugerirajući da promjena razine glutamata nije specifična za dijagnozu shizofrenije. Zanimljiv rezultat je da je povećanje intracelularnog kalcija u trombocitima nakon stimulacije receptora glutatomom bilo veće kod oboljelih sa shizofrenijom nego u kontroli, što sugerira da je NMDA receptor hiperosjetljiv, odnosno da nakon stimulacije glutatomom dolazi do veće struje kalcijevih iona prema unutrašnjosti trombocita (Uzbay i sur., 2013). Jedno istraživanje je pokazalo da se u plazmi oboljelih sa shizofrenijom mogu izmjeriti povišene koncentracije agmatina, endogene tvari koja se sintetizira iz L-arginina, a koja ima ulogu modulatora različitih neurotransmitorskih sustava, između ostalog i glutamatnog (Lai i sur., 2016). Također su nađeni povišeni omjeri D-/L-serina u plazmi u bolesnika rezistentnih na liječenje (Ohnuma i sur., 2008). Pored toga, pretpostavlja se da razina D-serina u plazmi pozitivno korelira s poboljšanjima pozitivnih simptoma, ali ne i s kognitivnim funkcijama oboljelima sa shizofrenijom. Studija koja je ispitala učinke atipičnog antipsihotika klopazina na razine D-serina, L-serina i glicina u bolesnika otpornih na liječenje, pokazala je povišene vrijednosti glicina te veći odnos glicin/L-serin nakon liječenja klopazinom, sugerirajući da bi L-serin i glicin u plazmi mogli biti potencijalni terapijski markeri (Ohnuma i sur., 2008).

### 4. 1. 3. 3. Ostali neurotransmitori

Od ostalih neurotransmitora povezanih s patogenezom shizofrenije, zabilježeno je da su razine  $\gamma$ -amino-maslačne kiseline u plazmi niže kod osoba sa shizofrenijom kao i kod osoba s bipolarnim poremećajem, u usporedbi s kontrolnom skupinom, odnosno zdravim ispitanicima. Suprotno tome, koncentracije reelina u plazmi, izvanstaničnog matriksnog glikoproteina koji je uključen u regulaciju sinaptičke plastičnosti te aktivnost adenzin deaminaze, homeostatskog modulatora koji utječe na moždanu dopaminsku i glutamatnu aktivnost, bile su povišene u oboljelih sa shizofrenijom (Lai i sur., 2016).

Vežano za kolinergički sustav, zabilježeno je smanjenje razine mRNA  $\alpha 7$  podjedinice acetilkolinških receptora (AChR) u limfocitima. Na te razine nije utjecala primjena antipsihotika, što ukazuje na dijagnostički potencijal tog markera (Lai i sur., 2016). Potrebna su daljnja istraživanja koja bi potvrdila vrijednost ovih nalaza.

### 4. 1. 4. Reakcija na oksidativni stres i metabolizam

Psihotični bolesnici većinom su dugoročno izloženi stanju oksidativnog stresa (Ruiz-Litago i sur., 2012). Markeri oksidativnog stresa, neurotoksični produkti uznapredovale glikacije proteina (AGE) veći su u oboljenih od shizofrenije (Arai i sur., 2010). Međutim, specifičnost tih markera nije zadovoljavajuća, budući da se određena odstupanja u njihovim vrijednostima mogu naći i u zdravih osoba.

U jednoj su studiji pokazane povišene razine produkata uznapredovale glikacije (pr. pentozidin), a snižene razine za njih specifičnog topljivog receptora R-AGE (koji poništava neurotoksično djelovanje) u perifernoj krvi bolesnika s određenim podtipom shizofrenije, koje ostaju stabilne tijekom bolesti, a ne mijenjaju se ovisno o intenzitetu simptoma ili dozi lijeka. Time je sugerirano da odnos koncentracije AGE/R-AGE može poslužiti kao dijagnostički marker shizofrenije (Takeda i sur., 2015).

Osobe s psihijatrijskim poremećajima, posebno shizofrenijom, imaju sklonost razvijanja metaboličkog sindroma (inzulinska rezistencija, abdominalna ili centralna pretilost, visoka razina kolesterola i povišen krvni tlak). Nekoliko istraživanja ispitivalo je promjene molekula uključenih u homeostazu glukoze. U studiji u kojoj su mononuklearne stanice periferne krvi stimulirane *ex vivo* stafilokoknim enterotoksinom B, 8 od ukupno 18 ispitivanih proteina bili su različito izraženi u stanicama bolesnika sa shizofrenijom u usporedbi s kontrolama. Ti proteini su pripadali glikolitičkom putu, čime je naznačeno da oslabljeni glikolitički odgovor može biti potencijalni dijagnostički biomarker shizofrenije (Herberth i sur., 2011). Također, otkriveno je da mitohondrijski kompleks I, prvi enzim u mitohondrijskom respiratornom lancu za oksidaciju glukoze, ima povećanu aktivnost u trombocitima bolesnika sa shizofrenijom te su izmjerene više razine mRNA u krvi oboljelih. Također je objavljeno da je aktivnost mitohondrijskog kompleksa trombocita povezana s pozitivnim simptomima shizofrenije i samim tijekom kliničke slike bolesti. Bitno je naglasiti da aktivnost trombocitnog mitohondrijskog kompleksa nije izmijenjena u bolesnika s bipolarnim poremećajem, niti kod osoba s poremećajima iz spektra autizma. Ovi posljednji nalazi o promijenjenoj aktivnosti mitohondrijskog kompleksa u trombocitima te povezanosti toga s pozitivnim simptomima i tijekom razvoja kliničke slike shizofrenije može biti potencijalno koristan biomarker (Lai i sur., 2016). Međutim, pokazano je da antipsihotici utječu na ekspresiju velikog broja gena za proteine uključene u homeostazu glukoze i da su neki od tih gena povezani s oksidativnim stresom i razvojem metaboličkih bolesti (Gubert i sur., 2013). Stoga se može reći da neke molekule, koje su uključene u homeostazu glukoze, umjesto da budu biomarkeri za dijagnozu, mogu biti potencijalni markeri ili za osjetljivost na nuspojave ili kao markeri za usklađivanje više lijekova (Herberth i sur., 2011).

#### 4. 1. 5. Epigenetska regulacija i micro RNA

Epigenetski čimbenici (metilacija DNA, modifikacije histona i dr.) mogu potencijalno utjecati na primjenjivost biomarkera kod bolesnika za shizofrenijom. Mnoga istraživanja pokazala su isti obrazac metilacija DNA kod oboljelih. Leukocitna DNA kod bolesnika sa shizofrenijom imala je niži sadržaj metiliranog deoksicitidina (mC) u usporedbi s kontrolama. Istraživanje koje se proširilo na genom pokazalo je da postoje 234 CpG mjesta (0,04% CpG mjesta) koja



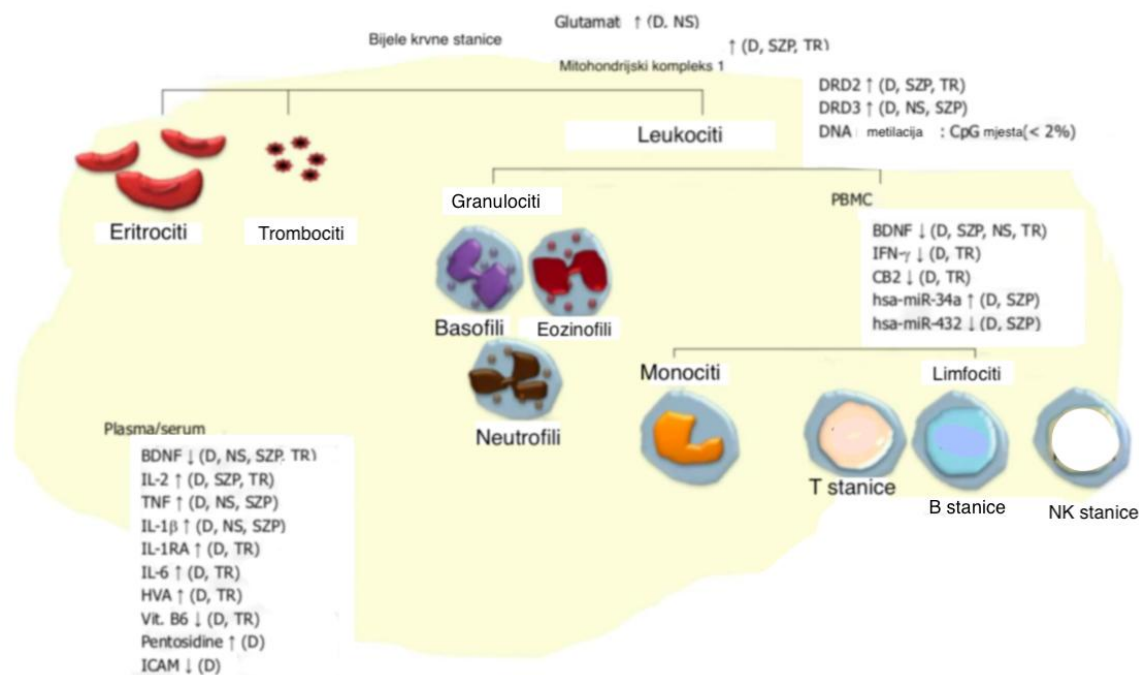
su različito metilirana kod shizofrenije u usporedbi s kontrolama, te kod oboljelog jednojajčanog blizanca u usporedbi sa zdravim, većinom na promotorskim regijama gena, zbog čega dolazi do promjena u transkripciji gena (Song i sur., 2014). Pokzano je također da je u mononuklearnim stanicama periferne krvi pacijenata tijekom prve epizode shizofrenije bilo 603 CpG mjesta (2% CpG mjesta) koja su bila različito metilirana, a posebno su bili pogođeni geni povezani s vezivanjem faktora transkripcije i nukleotida (Lai i sur., 2016). Međutim, još uvijek nije utvrđeno jesu li promjene metilacije povezane s promjenama razine ekspresije gena. Središnja regulatorna uloga mikroRNA (miRNA) u ekspresiji gena čini je obećavajućim biomarkerom za shizofreniju. Iako je bilo nekoliko istraživanja usmjerenih na miRNA u uzorcima iz mozga, relativno je malo njih proučavalo miRNA iz periferne krvi. Od ovih istraživanja pronađene promjene miRNA uključuju prilagodbu na više hsa-miR-34a i prilagodbu na niže hsa-miR-432 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kod bolesnika sa shizofrenijom. Međutim, podaci za ostale miRNA su kontradiktorni (Song i sur., 2014). Također je zabilježeno da se farmakološko liječenje može povezati s promjenama razine miRNA u ljudskoj plazmi, što je pokazano na staničnim linijama limfocita (Lai i sur., 2016). Razine ekspresije hsa-miR-365, hsa-miR-520c-3p i hsa-miR-181b u plazmi značajno su promijenjene nakon liječenja, od kojih su razine ekspresije miRNA-181b bile u pozitivnoj korelaciji s poboljšanjem negativnih simptoma. S obzirom na dobivene različite vrijednosti miRNA iz periferne krvi, ponavljani nalazi o ujednačenim razinama hsa-miR-34a i hsa-miR-432 tijekom procesa liječenja ukazuju na njihov potencijal kao dijagnostičkih markera (Sun i sur., 2014). Ovime se može zaključiti da periferni epigenetski markeri mogu biti obećavajući put pronalaska biomarkera za shizofreniju. Obrasci metilacije DNS i obrasci ekspresije miRNA pokazali su različitosti između bolesnika sa shizofrenijom i zdravih osoba. Međutim, uzimajući u obzir kontradiktorne rezultate, potrebna su daljnja istraživanja u tom području (Lai i sur., 2016).

#### 4. 1. 6. Istraživanja transkriptoma i proteoma

Suvremene metode i tehnologije omogućuju ispitivanja razina tisuća mRNA (ispitivanja transkriptoma) i proteina (ispitivanja proteoma) u isto vrijeme. U psihijatriji su ispitivanja transkriptoma uključivala upotrebu pune krvi, limfocita ili mononuklearnih stanica periferne

krvi, dok se istraživanja proteoma provode na eritrocitima, T stanicama i serumu, a sve s ciljem utvrđivanja mogućih promjena razina mRNA i proteina (Lai i sur., 2016). Ovakav pristup ima za posljedicu velik broj mRNA ili proteina kao mogućih biomarkera za shizofreniju, međutim potrebna su daljnja istraživanja u ovom području. Ukratko, istraživanje na uzorcima pune krvi bolesnika tijekom akutne epizode shizofrenije pokazalo je povećanu ekspresiju gena za transporter glukoze i faktor skupljanja aktina (DAAM2), dok je ekspresija gena za  $Zn^{2+}$ -metalopeptidazu, neurolizin 1 i miozin C značajno smanjena u usporedbi s kontrolom, što ukazuje da periferna mRNA ovih gena može biti potencijalni biomarker u ranom stadiju bolesti (Huang i sur., 2008).

Proteomska istraživanja rezultirala su identifikacijom čak 34 serumska proteina koji pokazuju 60% -75% točnosti u razlikovanju shizofrenije od velike depresije, bipolarnog poremećaja, Aspergerova sindroma i kontrola, što sugerira da su ti proteini u krvnom serumu potencijalni biomarkeri shizofrenije (Huang i sur., 2008). Zabilježeno je da disregulacija 4 analita u serumu (povećana količina karboksilne kiseline, smanjenje regulacije 6-deoksimanofuranoze, galaktozeoksima i serumskog peptida (m/z 3177) ima najbolju diskriminativnu vrijednost kod bolesnika sa shizofrenijom u odnosu na kontrole, što sugerira da se metabolomički i proteomski pristupi mogu koristiti u istraživanju biomarkera. Općenito, ishod trenutnih istraživanja je identifikacija većeg broja potencijalnih biomarkera u perifernoj krvi s velikim brojem rezultata koji sugeriraju da bi markeri povezani s funkcijom imunskog sustava reakcijom/upalom mogli biti od posebnog interesa, no njihova specifičnost još uvijek nije potvrđena, što zahtijeva daljnja istraživanja (Lai i sur., 2016).



Slika 3- Prikaz potencijalnih perifernih biomarkera za shizofreniju. Oznake su klasificirane kao dijagnostičke (D), antipsihotične (TR) ili oboje. Ovi markeri koreliraju sa fenotipom (tj. sa kliničkim simptomima ili kognitivnim funkcijama) kod osoba sa shizofrenijom. Neki su markeri bili NS za shizofreniju. PBMC: mononuklearna stanica periferne krvi; BDNF: neurotrofni faktor porijeklom iz mozga; IL: Interleukin; TNF: Faktor nekroze tumora; HVA: Homovanilna kiselina; Vit. B6: Vitamin B6 (piridoksamin); ICAM: molekula međustanične adhezije; DRD2: Dopaminski receptori D2; IFN: Interferon; CB2: kanabinoidni receptor; TR: Odgovor na liječenje; NS: Nije specifično (Lai i sur., 2016).

## 5. ZAKLJUČCI

Shizofrenija je ozbiljan, složen i iscrpljujući neuropsihijatrijski poremećaj koji je tradicionalno povezan s lošim ishodom liječenja u odnosu na neke druge psihijatrijske poremećaje. Da bi se bolest mogla na vrijeme i pravilno dijagnosticirati, a ishodi liječenja učinkovito pratiti, neophodni su specifični biomarkeri.

Biomarkeri, koji se mjere u lako dostupnim tjelesnim tekućinama, najčešće venskoj krvi, ukazuju na normalan ili patološki odgovor organizma, kao i farmakološki odgovor na primijenjenu terapiju.

Potruga za biomarkerima kod shizofrenije brzo napreduje, međutim potrebna su daljnja istraživanja. Zbog kompleksne patofiziologije shizofrenije, postoji nekoliko mogućih biomarkera. Istraživanja biomarkera shizofrenije se mogu razvrstati u nekoliko pristupa koji uključuju: (1) istraživanja povezana s neurotrofnim faktorom porijeklom iz mozga (BDNF) i (2) molekulama uključenim u upalu i funkciju imunskog sustava; zatim (3) neurokemije analize; (4) ispitivanja molekula uključenih u oksidativni stres i metabolizam; (5) epigenetsku regulaciju i miRNA; te (6) analize transkriptoma i proteoma.

S obzirom na nereproducibilne, te često kontradiktorne rezultate koji dolaze iz različitih istraživanja, kao i nespecifičnost određenih biomarkera za samu shizofreniju, potrebna su daljnja usmjerena istraživanja u tom području.

Identifikacija biomarkera u dijagnostici shizofrenije ili kao prediktora odgovora na liječenje shizofrenije predstavljao bi vrlo važan napredak koji bi mogao omogućiti personalizirano liječenje te utjecati na razvoj novih generacija antipsihotika u budućnosti.

## 6. LITERATURA

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders—fifth edition: DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013

Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M, Ichikawa T, Nishida A, Tanaka Y, Furukawa A, Aikawa Y, Kuroda O, Niizato K, Izawa R, Nakamura K, Mori N, Matsuzawa D, Hashimoto K, Iyo M, Sora I, Matsushita M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Miyata T, Itokawa M. Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67, 589-597

Berk M, Plein H, Csizmadia T. Supersensitive platelet glutamate receptors as a possible peripheral marker in schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*, 1999, 14, 119-122

Curley A, Lewis D. A. Cortical basket cell dysfunction in schizophrenia. *J. Physiol*, 2012, 590, 715–724

Dauvermann MR, Lee G, Dawson N. Glutamatergic regulation of cognition and functional brain connectivity: insights from pharmacological, genetic and translational schizophrenia research. *Br J Pharmacol*, 2017, 174, 3136-3160

Dean B. Understanding the role of inflammatory-related pathways in the pathophysiology and treatment of psychiatric disorders: evidence from human peripheral studies and CNS studies. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2011, 14, 997-1012

Elman I, Lukas S, Shoaf SE, Rott D, Adler C, Breier A. Effects of acute metabolic stress on the peripheral vasopressinergic system in schizophrenia. *J Psychopharmacol*, 2003, 17, 317-323

Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, Streck EL, Gama CS, Kapczinski F, Kunz M. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *J Psychiatr Res*, 2013, 47, 1396-1402

Henriksen MG, Nordgaard J, Jansson LB. Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. *Front Hum Neurosci*, 2017, 11, 322

Herberth M, Koethe D, Cheng TM, Krzyszton ND, Schoeffmann S, Guest PC, Rahmoune H, Harris LW, Kranaster L, Leweke FM, Bahn S. Impaired glycolytic response in peripheral blood mononuclear cells of first-onset antipsychotic-naive schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*, 2011, 16, 848-859

Huang JT, Wang L, Prabakaran S, Wengenroth M, Lockstone HE, Koethe D, Gerth CW, Gross S, Schreiber D, Lilley K, Wayland M, Oxley D, Leweke FM, Bahn S. Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues. *Mol Psychiatry*, 2008, 13, 1118-1128

Hyde, T. M. *et al.* Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. *J. Neurosci*, 2011, 31, 11088–11095

Kahn, R. S., Iris E. Sommer, Robin M. Murray, Andreas Meyer-Lindenberg, Daniel R. Weinberger, Tyrone D. Cannon, Michael O'Donovan, Christoph U. Correll, John M. Kane, Jim van Os and Thomas R. Insel. Schizophrenia is a cognitive illness: time for a change in focus. *Disease primers*, 2015, 1, 3-5

Krishna R. Patel, PharmD, RPh, Jessica Cherian, PharmD, RPh, Kunj Gohil, PharmD, RPh, and Dylan Atkinson. Schizophrenia: Overview and Treatment Options *Pharmacy and Therapeutics*, 2014, 39, 638-645

Lai Chi-Yu, Elizabeth Scarr, Madhara Udawela, Ian Everall, Brian Dean. Biomarkers in schizophrenia: *A focus on blood based diagnostics and theranostics*, 2016, 6, 102-117

Michael J Owen, Akira Sawa, Preben B Mortensen, *Schizophrenia*, 2016, 388, 86-97

Ohnuma T, Sakai Y, Maeshima H, Hatano T, Hanzawa R, Abe S, Kida S, Shibata N, Suzuki T, Arai H. Changes in plasma glycine, L-serine, and D-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32, 1905-1912

Psihotički poremećaji prema MKB-10, 2017,

[www.http://www.plivamed.net/medicus/clanak/13398/Klinicka-obiljezja-i-dijagnoza-psihoticnih-poremecaja.html](http://www.plivamed.net/medicus/clanak/13398/Klinicka-obiljezja-i-dijagnoza-psihoticnih-poremecaja.html), pristupljeno 20.7.2019.

Ruiz-Litago F, Seco J, Echevarría E, Martínez-Cengotitabengoa M, Gil J, Irazusta J, González-Pinto AM. Adaptive response in the antioxidant defence system in the course and outcome in first- episode schizophrenia patients: a 12-months follow-up study. *Psychiatry Res*, 2012, 200, 218-222

Singh AN, Barlas C, Saeedi H, Mishra RK. Effect of loxapine on peripheral dopamine-like and serotonin receptors in patients with schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*, 2003, 28, 39-47

Song HT, Sun XY, Zhang L, Zhao L, Guo ZM, Fan HM, Zhong AF, Niu W, Dai YH, Zhang LY, Shi Z, Liu XP, Lu J. A preliminary analysis of association between the down-regulation of microRNA-181b expression and symptomatology improvement in schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment. *J Psychiatr Res*, 2014, 54, 134-140

Sun XY, Lu J, Zhang L, Song HT, Zhao L, Fan HM, Zhong AF, Niu W, Guo ZM, Dai YH, Chen C, Ding YF, Zhang LY. Aberrant microRNA expression in peripheral plasma and mononuclear cells as specific blood-based biomarkers in schizophrenia patients. *J Clin Neurosci*, 2015, 22, 570-574

Takeda M, Ohnuma T, Takeuchi M, Katsuta N, Maeshima H, Takebayashi Y, Higa M, Nakamura T, Nishimon S, Sannohe T, Hotta Y, Hanzawa R, Higashiyama R, Shibata N, Gohda T, Suzuki Y, Yamagishi S, Tomino Y, Arai H. Altered serum glyceraldehyde- derived advanced glycation end product (AGE) and soluble AGE receptor levels indicate carbonyl stress in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett*, 2015, 593, 51-55

Tomasik J, Rahmoune H, Guest PC, Bahn S. Neuroimmune bio- markers in schizophrenia. *Schizophr Res*, 2014, 176, 3-13

Uzbay T, Goktalay G, Kayir H, Eker SS, Sarandol A, Oral S, Buyukuysal L, Ulusoy G, Kirli S. Increased plasma agmatine levels in patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res*, 2013, 47, 1054-1060

Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ, Cascorbi I. Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology*, 2004, 50, 305-310

# 7.SAŽETAK/SUMMARY

## Sažetak

Shizofrenija je kronični psihički poremećaj karakteriziran mnoštvom simptoma koji se dijele na pozitivne (deluzije, halucinacije, nepovezan govor i paranoidne i sumanute ideje), negativne (manjak motivacije, emocionalno povlačenje i dr.) te kognitivne simptome (poteškoće s koncentracijom, učenjem i kratkotrajnim pamćenjem). Simptomi se većinom pojavljuju u adolescenciji ili ranoj odrasloj dobi. Veoma je važno identificirati oboljele u najranijim fazama poremećaja jer rana identifikacija i početak liječenja značajno poboljšava kliničke ishode liječenja. Trenutno se dijagnoza shizofrenije oslanja isključivo na subjektivnu interpretaciju kliničkih simptoma koje pokazuju oboljeli. Postoje različite teorije o nastanku patofizioloških promjena kod shizofrenije, pri čemu su neurokemijske teorije najčešće i temelje se na disfunkcijama u različitim neurotransmitskim sustavima, posebice dopaminskom, serotoninском i glutamatnom. Da bi se bolest mogla na vrijeme i pravilno dijagnosticirati, a ishodi liječenja učinkovito pratiti, neophodni su specifični biomarkeri. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji biomarkeri se definiraju kao bilo koja mjera koja reflektira interakciju između biološkog sustava i potencijalnog kemijskog, biološkog ili fizikalnog štetnog čimbenika. Razvijeni su različiti laboratorijski pristupi za prepoznavanje biomarkera i njihove funkcije u patofiziologiji shizofrenije, kao što su istraživanja povezana s: neurotrofnim faktorom porijeklom iz mozga (BDNF), molekulama uključenim u upalu i funkciju imunskog sustava, oksidativni stres i metabolizam, zatim s različitim neurokemijskim analizama, epigenetskom regulacijom i miRNA te analizom transkriptoma i proteoma. Istraživanja specifičnih biomarkera brzo napreduju, no zbog kompleksnosti same bolesti i nespecificnosti dosadašnjih pristupa, potraga za najboljima i dalje traje.

## Summary

Schizophrenia is a chronic psychiatric disorder characterized by many symptoms which are divided into positive (delusions, hallucinations, disconnected speech and paranoid and delusional ideas), negative (lack of motivation, emotional withdrawal, etc.) and cognitive symptoms (difficulty with concentrating, learning and short-term memory). Most of the symptoms occur in adolescence or early adulthood. It is very important to identify patients in the earliest



stage of the disorder because early identification and initiation of treatment significantly improves the clinical outcomes of the treatment. Currently, the diagnosis of schizophrenia relies only on the subjective interpretation of the clinical symptoms displayed by patients. There are various theories on the occurrence of pathophysiological changes in schizophrenia, with neurochemical theories being the most common. Most of these theories focus on dysfunctions in various neurotransmitter systems, especially dopamine, serotonin and glutamate. Specific biomarkers are required to diagnose the disease in a timely and correct manner and to effectively monitor treatment outcomes. According to the World Health Organization, biomarkers are defined as any measure that reflects the interaction between a biological system and a potential chemical, biological or physical detrimental factor. Various laboratory approaches have been developed to identify biomarkers and their functions in the pathophysiology of schizophrenia, such as studies related to: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), molecules involved in inflammation and immune system function, oxidative stress and metabolism, followed by various neurochemical analyzes, epigenetic regulation and miRNAs, and transcriptome and proteome analysis. The search for specific biomarkers is progressing rapidly, but due to the complexity of the disease itself and the specificity of biomarkers so far, the search for the best is still ongoing.

## **8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za farmakologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Pristupi u istraživanju biomarkera shizofrenije

Ivona Divić

### SAŽETAK

Shizofrenija je kronični psihički poremećaj karakteriziran mnoštvom simptoma koji se dijele na pozitivne (deluzije, halucinacije, nepovezan govor i paranoidne i sumanute ideje), negativne (manjak motivacije, emocionalno povlačenje i dr.) te kognitivne simptome (poteškoće s koncentracijom, učenjem i kratkotrajnim pamćenjem). Simptomi se većinom pojavljuju u adolescenciji ili ranoj odrasloj dobi. Veoma je važno identificirati oboljele u najranijim fazama poremećaja jer rana identifikacija i početak liječenja značajno poboljšava kliničke ishode liječenja. Trenutno se dijagnoza shizofrenije oslanja isključivo na subjektivnu interpretaciju kliničkih simptoma koje pokazuju oboljeli. Postoje različite teorije o nastanku patofizioloških promjena kod shizofrenije, pri čemu su neurokemijske teorije najčešće i temelje se na disfunkcijama u različitim neurotransmitorskim sustavima, posebice dopaminskom, serotoninском i glutamatnom. Da bi se bolest mogla na vrijeme i pravilno dijagnosticirati, a ishodi liječenja učinkovito pratiti, neophodni su specifični biomarkeri. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji biomarkeri se definiraju kao bilo koja mjera koja reflektira interakciju između biološkog sustava i potencijalnog kemijskog, biološkog ili fizikalnog štetnog čimbenika. Razvijeni su različiti laboratorijski pristupi za prepoznavanje biomarkera i njihove funkcije u patofiziologiji shizofrenije, kao što su istraživanja povezana s: neurotrofnim faktorom porijeklom iz mozga (BDNF), molekulama uključenim u upalu i funkciju imunskog sustava, oksidativni stres i metabolizam, zatim s različitim neurokemijskim analizama, epigenetskom regulacijom i miRNA te analizom transkriptoma i proteoma. Istraživanja specifičnih biomarkera brzo napreduju, no zbog kompleksnosti same bolesti i nespecifičnosti dosadašnjih pristupa, potraga za najboljima i dalje traje.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 29 stranica, 3 grafička prikaza, 1 tablica i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Shizofrenija, biomarkeri, specifičnost, BDNF, neurokemija, epigenetika

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medicinal Biochemistry  
Department of Pharmacology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **Approaches in the investigation of biomarkers for schizophrenia**

**Ivona Divić**

#### **SUMMARY**

Schizophrenia is a chronic psychiatric disorder characterized by many symptoms which are divided into positive (delusions, hallucinations, disconnected speech and paranoid and delusional ideas), negative (lack of motivation, emotional withdrawal, etc.) and cognitive symptoms (difficulty with concentrating, learning and short-term memory). Most of the symptoms occur in adolescence or early adulthood. It is very important to identify patients in the earliest stage of the disorder because early identification and initiation of treatment significantly improves the clinical outcomes of the treatment. Currently, the diagnosis of schizophrenia relies only on the subjective interpretation of the clinical symptoms displayed by patients. There are various theories of pathophysiological changes in schizophrenia, with neurochemical theories being the most common. Most of these theories focus on dysfunctions in neurotransmitter systems, especially dopamine, serotonin and glutamate. Specific biomarkers are required to diagnose the disease in a timely and correct manner and to effectively monitor treatment outcomes. According to the World Health Organization, biomarkers are any measure that reflects the interaction between a biological system and a potential chemical, biological or physical detrimental factor. Various laboratory approaches have been developed to identify biomarkers and their functions in the pathophysiology of schizophrenia, such as studies related to: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), molecules involved in inflammation and immune system function, oxidative stress and metabolism, followed by various neurochemical analyzes, epigenetic regulation and miRNAs, and transcriptome and proteome analysis. The search for specific biomarkers is progressing rapidly, but due to the complexity of the disease itself and the unspecificity of biomarkers so far, the search for the best is still ongoing.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 29 pages, 3 figures, 1 table and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Schizophrenia, biomarkers, specificity, BDNF, neurochemistry, epigenetics

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marijana Zovko Končić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.

